

PF 0000053791

1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Oxidation von Carotinoiden, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Carotinoid in Gegenwart eines Enzyms mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität aus Bakterien der Gattung *Thermus sp.* umsetzt und das Oxidationsprodukt isoliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man
  - a1) einen rekombinanten Mikroorganismus, welcher ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität produziert, in einem Kulturmedium in Gegenwart von exogenem oder intermediär gebildetem  $\beta$ -Carotin kultiviert; oder
  - a2) ein  $\beta$ -Carotin-haltiges Reaktionsmedium mit einem Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität inkubiert; und
  - b) das gebildete Oxidationsprodukt oder ein Folgeprodukt davon aus dem Medium isoliert.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Oxidationsprodukt Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Adonirubin, Astaxanthin, Lutein oder Gemische davon umfasst.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die Oxidation durch Kultivierung des Mikroorganismus in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Kultivierungstemperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus durch heterologe Komplementierung zur Carotinoidproduktion befähigt ist und außerdem ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität exprimiert.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Carotinoid als exogenes Substrat einem Medium zusetzt und die Oxidation durch enzymatische Umsetzung des substrathaltiges Mediums in Gegenwart von Sauerstoff bei einer Temperatur von mindestens etwa 20°C und einem pH-Wert von etwa 6 bis 9 durchführt, wobei das substrathaltige Medium außerdem bezogen auf das Substrat

M/43191

GEÄNDERTES BLATT

PF 0000053791

2

einen etwa 10-bis 100-fachen molaren Überschuss an Reduktionsäquivalenten enthält.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Cytochrom P450 Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche eine Teilsequenz von Aminosäurerest Pro328 bis Glu345 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche außerdem eine Teilsequenz von Aminosäurerest Val216 bis Ala227 gemäß SEQ ID NO:2 umfasst.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche wenigstens eine weitere Teilsequenz umfasst, die ausgewählt ist unter Teilsequenzen von wenigstens 10 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aus den durch die Aminosäurereste Met1 bis Phe327 und Gly346 bis Ala389 gemäß SEQ ID NO:2 vorgegebenen Sequenzbereichen.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Monooxygenase eine Aminosäuresequenz aufweist, welche im wesentlichen SEQ ID NO: 2 entspricht.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Cytochrom P450 Monooxygenase aus einer Bakterium der Spezies *Thermus thermophilus* verwendet.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche wobei man einen rekombinanten Mikroorganismus kultiviert, der ein Expressionskonstrukt trägt, welches unter der Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 11 umfasst.

13. Verwendung einer Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 11 oder einer dafür kodierenden Nukleotidsequenz zur mikrobiologischen Oxidation von Carotinoiden.

14. Rekombinanter Mikroorganismus, welcher durch heterologe Komplementierung zur  $\beta$ -

M/43191

PF 0000053791

3

Carotinproduktion befähigt ist und außerdem ein Enzym mit Cytochrom P450 Monooxygenase Aktivität exprimiert.

- 5 15. Mikroorganismus nach Anspruch 14, welcher mit carotinogenen Genen heterolog komplementiert ist.
16. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 und 15, abgeleitet von Bakterien der Gattung *Escherichia* sp.
- 10 17. Mikroorganismus nach Anspruch 16, abgeleitet von *E. coli*, insbesondere *E. coli* JM 109.
- 15 18. Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 14 bis 17, transformiert mit einem Expressionsvektor, der unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleotidsequenzen die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 11 umfasst.
- 20 19. Expressionsvektor, umfassend die kodierende Sequenz für eine Cytochrom P450 Monooxygenase gemäß der Definition in einem der Ansprüche 7 bis 11 welche stromaufwärts mit dem starken *tac*-Promotor und stromabwärts mit dem starken *rrnB* ribosomalen Terminator operativ verknüpft ist.

M/43191

GEAENDERTES BLATT